

ライン状心筋細胞ネットワークの伝導と配向性に関する解析と心毒性検査への応用

著者	吉田 鉄郎
出版者	法政大学大学院理工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	61
ページ	1-2
発行年	2020-03-24
URL	http://doi.org/10.15002/00022954

ライン状心筋細胞ネットワークの 伝導と配向性に関する解析と心毒性検査への応用

ANALYSIS OF LINE-NETWORKED CARDIOMYOCYTES CONDUCTION AND ORIENTATION
AIMING APPLICATION FOR PRE-CLINICAL ASSESSMENT

吉田 鉄郎

Tetsuro YOSHIDA

指導教員 金子 智行

法政大学 大学院 理工学研究科 生命機能学専攻 修士課程

Multi-Electrode Array (MEA) system has been used to analyze the heart conduction. However, the conduction velocity in dispersed culture was different from an actual heart. In addition, pre-clinical assessment is necessary to produce new medicines and MEA is expected to be used. Nevertheless, some side effects cannot be found with current indexes. In this study, we recreated Line-Networked Cardiomyocytes (LiNC) in various width on the MEA and measured conduction velocity as a new index. As a result, LiNC was generally conducted in the same direction linearly. The narrower LiNC had the faster conduction. Furthermore, conduction disorder was occurred when Quinidine, Na^+ Channel Blocker was added while current indexes had ordinary value.

Key Words : *Cardiomyocytes, Conduction Velocity, pre-clinical assessment, multi electrode array system*

1. 緒言

1 つの心筋細胞から心臓のような組織や器官を再構成することは、単純な細胞集団を作ることとは異なる。例えば、心筋細胞の伝導速度は、分散培養した際と実際の心臓とで大きく異なることが知られている。また、新規医薬品開発にあたって、心毒性検査を行うことは必要不可欠であるが、医薬品の中には心臓の不整脈を引き起こすものが報告されている。既存指標である拍動間隔(ISI : Inter Spike Interval)や電位持続時間 (FPD : Field Potential Duration)のみでは正確な検査を行うことができない。これらの問題を解決し、心筋細胞の伝導に関する解析手法として多電極電位計測(MEA : Multi-Electrode Array)システムが注目されている。MEA システムは、電極上に播種した細胞から細胞外電位を測定し、再構成した心筋細胞の伝導解析を行うことができる[1]。よって本研究では、アガロース微細加工技術を用いて MEA 電極上にアガロースマイクロチャンバー(AMC : Agarose Micro Chamber)を作製し、4 種類の幅でライン状心筋細胞ネットワーク(LiNC : Line-Networked Cardiomyocytes)を再構成した。その LiNC 中の伝導や配向性の解析と LiNC の伝導速度を用いた心毒性検査を行った。

2. 実験方法

(1) ライン状心筋細胞ネットワーク作製

コラーゲンを塗布した MED プローブ上に、アガロース

をスピンコートし、赤外線レーザーでアガロースを溶かして AMC を作製した(図 1)。そこに単離したニワトリ 7 日胚心筋細胞を播種し、AMC-10, 20, 50, 120, 200 (幅 : 10, 20, 50, 120, 200 μm)の LiNC を作製し比較した。

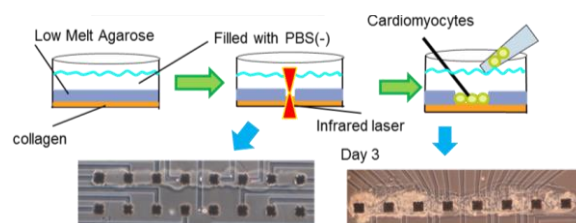


図1 AMC 作製と LiNC 再構成

レーザー照射部位はコラーゲンが露出し、心筋細胞が張り付き、LiNC を再構成することができる。

スケールバー : 150 μm

(2) 細胞外電位計測と伝導速度・経路解析

MEA システムを用いて、LiNC の細胞外電位計測を行い、伝導の解析を行った(図 2)。ISI や FPD に加えて、電極間距離を隣接電極間の Na^+ ピークの時間差で割り伝導速度を算出した。その値の安定性を検証するため、Coefficient of Variation (CV) = $\text{SD} / \text{mean} \times 100 (\%)$ を算出した。加えて、LiNC の構造や伝導経路の検証を行うために、核とアクチンを染色し、蛍光顕微鏡で、核や細胞骨格の配向性に関する観察を行った。

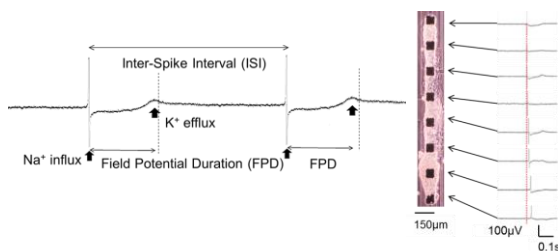


図2 細胞外電位計測とLiNC伝導速度測定

3. 結果と考察

(1) 幅変化時のLiNC伝導速度変化

4種類の幅の異なるLiNCにおいて伝導速度の比較を行った。その中では、最も小さなAMC-20が速い伝導を示したのに対して、大きいAMC-200が一番遅かった。したがってサイズが小さくなることで、ネットワーク中の伝導経路が単純化し、一方向への伝導は速くなることが示唆された。CVは、AMC-200が一番大きかった。LiNCの大きさが、AMC-50と比べて大きくなったため、伝導の妨げになる介在板が多く存在し、伝導速度の低下につながったと考えられる[2]。また、AMC-200はLiNC中の伝達経路が複数存在し複雑化したためであると思われる。

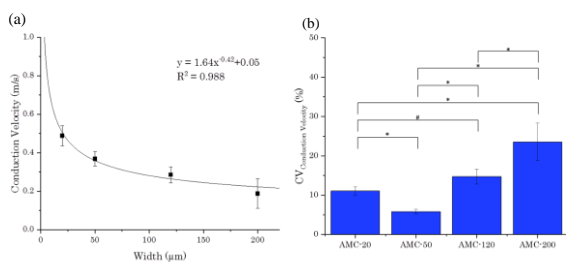


図3 LiNC伝導速度とCV比較

a) 幅変化時の伝導速度 エラーバー: SD

b) 伝導速度のCV エラーバー: SE * $p < 0.001$ # $p < 0.005$

(2) 幅変化時のLiNC配向性

LiNCを蛍光染色し、核のアスペクト比と配向角の分散を用いて、LiNCの配向性解析を行った。アスペクト比は、分散培養に対して、各幅で再構成したLiNCと有為な差が生じていた。AMCによって細胞の向きは制御できることが示唆された。また、配向角の分散に関して、実際の心筋細胞に近似して作製されたAMC-10は、幅の広いものと比べて明らかにばらつきが小さかった。これは、実際の心臓中に構成されている心筋細胞の筋繊維を再現出来たためであると考えられる。

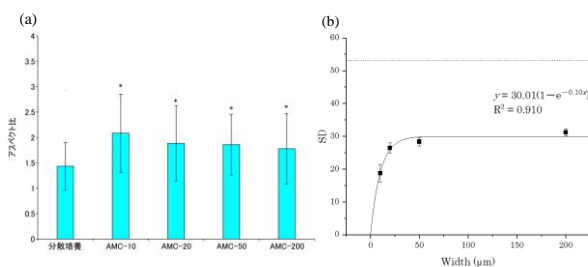


図4 核のアスペクト比と配向角の分散

a) 幅変化時の核アスペクト比 エラーバー: SD

b) 配向角SD エラーバー: SE 点線(分散培養): 53.1

(3) LiNCを用いた心毒性検査への応用

幅変化時の伝導速度・伝導経路の解析において、AMC-50が一番安定的な拍動や伝導を示していたため、それを用いた心毒性検査を行った。既存指標のISIやFPDに加えて、伝導速度解析を行い、心毒性検査プロトコルの確立や、評価方法に関する考察を行った。特に特徴的であったNa⁺チャネル阻害剤であるQuinidineの結果を示す(図5)。ISIは、最高血中濃度(C_{max})である3.0 μ Mまでは大きな変化はなかったが、10 μ Mの浸透時間中に拍動が停止した。加えて、CV_{ISI}は3.0 μ Mまでは、10%以下であり、安定拍動をしていた。Washをするするとすぐに拍動を再開し、薬剤が可逆的であることが示唆された。高濃度では脱分極が阻害され、立ち上がり速度(V_{max})が低下し、最終的に拍動停止に至ったと考えられる。同様に、伝導速度に関する指標を用いた解析を行った。伝導速度は、1.0 μ Mから遅くなり、 C_{max} である3.0 μ Mでもその傾向があった。加えて、伝導速度のゆらぎを表すSTV_{conduction velocity}は薬剤添加直後すぐに大きくなり、Wash1で拍動が再開した時も揺らぎが大きかったが、Wash2でCtrl程度に戻っていた。FPDに関する解析では、大きな変化は見られなかった。これらの結果より、Na⁺チャネル阻害に関する解析には、ISIやFPDのみで判断することは難しく、伝導速度を解析することで、心毒性検査を行うことが可能であると示唆された。

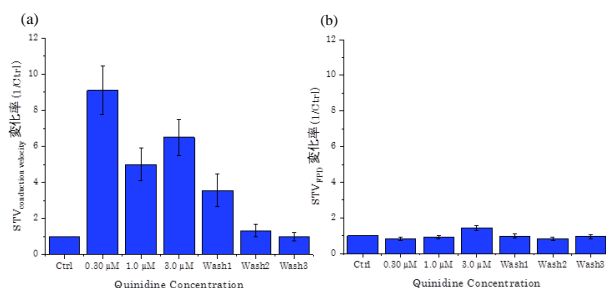


図5 Na⁺チャネル阻害時伝導速度・FPDのSTV変化率

a) 伝導速度のQuinidine濃度依存的STV変化

b) FPDのQuinidine濃度依存的STV変化

エラーバー: SD

4. 結言

LiNCは幅が狭くなると伝導速度が速くなり、広くなると遅くなる相関を得ることが出来た。ネットワークの配向性解析より、幅を狭くすると、核の配向角の分散は小さくなる傾向があり、より幅を狭くすることで、心臓の再構成モデルを作製できる可能性が示された。心毒性検査への応用として、Na⁺チャネル阻害に関する指標として伝導速度は有効であることが示唆された。

参考文献

- 1) Kaneko T. *et al.* (2014) *Scientific Reports*, **4**, 4670
- 2) Adriana B. *et al.* (2019) *Stem Cell Reports*, **12**, 982-995